

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

RENATO SIMÕES GASPAR

**Síndrome dos Ovários Policísticos Induzida por L-glutamato Monossódico em Ratas:
Novo Olhar sobre um Clássico Modelo de Obesidade**

São Luís

2015

RENATO SIMÕES GASPAR

**Síndrome dos Ovários Policísticos Induzida por L-glutamato Monossódico em Ratas:
Novo Olhar sobre um Clássico Modelo de Obesidade**

Artigo Científico apresentado ao Curso de Medicina da
Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do
grau de Médico.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes.

São Luís

2015

RENATO SIMÕES GASPAR

**Síndrome dos Ovários Policísticos Induzida por L-glutamato Monossódico em
Ratas: Novo Olhar sobre um Clássico Modelo de Obesidade**

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes (Orientador)

Profa. Ms. Lilalea Gonçalves França (Examinadora)

Prof. Dr. Leonardo Carvalho Silva (Examinador)

Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias (Examinador)

Aos meus pais, Ângela e Antônio, pelo amor

Ao meu irmão, Gabriel, pelo companheirismo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio e Ângela, que se mostraram verdadeiros exemplos. Obrigado pelo amor incondicional, pelos conselhos e pelo que sou, graças a vocês. Sinto muito orgulho de fazer parte desta família.

Ao meu irmão Gabriel, por me fazer sonhar sempre mais alto. Obrigado por mostrar que a distância não é impeditivo para a amizade, o companheirismo e o amor.

Aos meus irmãos André, Antônio, Edilson e Tiago, pelos bons momentos, as festas e os apelidos.

À minha avó Regina, que sempre cuidou de mim e me ensinou os valores que sigo.

A Isadora, por acreditar em mim mais do que eu mesmo. Obrigado por me permitir compartilhar um pouco da vida contigo.

Aos meus tios e tias: Alkinder, Renata e Polyanna, e meu primo Renatinho, que compõem a felicidade de todos os domingos.

Ao professor Marcus Paes, mais do que um cientista de mente invejável, revelou-se conselheiro e amigo. Obrigado por me incentivar cada dia mais pelos caminhos incertos (e deslumbrantes!) da ciência.

Ao LEFisio, por ser um reduto de felicidade. Obrigado não só pelos experimentos, discussões e produção científica, mas pelas confraternizações e amizades verdadeiras.

Aos meus amigos e amigas, que me aturam e fazem de mim uma pessoa melhor. Obrigado por compartilharem suas felicidades e seus momentos de desamparo. Eu não poderia estar rodeado de pessoas melhores.

"O maior bem do homem é uma mente inquieta."

(Isaac Azimov)

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	<u>8</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>9</u>
<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>10</u>
<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>12</u>
<u>RESULTADOS</u>	<u>16</u>
<u>DISCUSSÃO</u>	<u>23</u>
<u>AGRADECIMENTOS</u>	<u>29</u>
<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>29</u>
<u>ESPECIFICAÇÕES DA REVISTA</u>	<u>39</u>

RESUMO

1
2 Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) é o distúrbio de fertilidade mais comum em mulheres.
3 É caracterizada por hiperandrogenismo sérico ou clínico, oligo/anovulação e presença de cistos
4 nos ovários; ainda que um fenótipo de síndrome metabólica também parece ser necessário. A
5 ampla heterogeneidade de seus fatores de risco tem colocado a etiologia da SOP no foco de
6 intensa investigação científica, especialmente porque há uma falta de modelos experimentais
7 que reproduzam fenótipos encontrados em mulheres. Portanto, no presente trabalho, revisitamos
8 o modelo de obesidade neuroendócrina clássica induzida por L-glutamato monossódico (MSG)
9 e o propomos como um novo modelo para estudos sobre a fisiopatologia da SOP. Para tanto,
10 injetou-se MSG (4 g/kg/dia) ou solução salina equiosmolar (CTR) por via subcutânea em ratas
11 recém-nascidas, a cada dois dias, até o 10º dia pós-natal. No 60º dia pós-natal, o ciclo estral
12 passou a ser avaliado por esfregaços vaginais duas vezes ao dia, durante 15 dias. Em seguida, os
13 animais foram sacrificados na fase estro para coleta de sangue e órgãos. Quando comparadas
14 com o CTR, ratas MSG tinham Índice de Lee aumentado, acúmulo de gordura retroperitoneal e
15 visceral, bem como hipertrofia dos adipócitos viscerais. Estas eram, ainda, dislipidêmicas, mas
16 não apresentaram hiperglicemia ou hiperandrogenemia. Ratas MSG demonstraram ser
17 oligocíclicas e obtiveram uma diminuição de 50% na contagem de oócitos quando comparadas
18 com CTR. Notavelmente, ratas MSG exibiram 06 vezes mais cistos foliculares no ovário,
19 juntamente com maior número de folículos totais, primordiais e atresicos. A análise
20 imunohistoquímica constatou que ratas MSG tiveram um acréscimo de 04 vezes na coloração de
21 hormônio anti-mülleriano em folículos antrais. Em suma, os dados aqui apresentados
22 caracterizam o modelo de obesidade MSG como um modelo acessível e fácil manutenção para
23 estudar vias metabólicas na fisiopatologia da SOP em ratas jovens.

24

25 **Palavras-Chave:** L-Monossódio glutamato. Obesidade hipotalâmica. Síndrome metabólica.
26 Síndrome dos ovários policísticos. Fisiopatologia.

27

ABSTRACT

28 Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is the most common fertility disorder in women. It is
29 clinically characterized by hyperandrogenism, oligo/anovulation, and polycystic ovarian
30 morphology; albeit a metabolic syndrome phenotype seems also to be required. The broad
31 heterogeneity of its risk factors has kept PCOS etiology under intense research, especially
32 because there is a lack of experimental models that fulfill human PCOS mechanisms. Therefore,
33 in the present work we revisited the classical neuroendocrine obesity model induced by
34 monosodium L-glutamate (MSG) and characterized it as a new potential model for PCOS
35 pathophysiology studies. Newborn female rats were subcutaneously injected with MSG
36 (4g/kg/day) or equiosmolar saline (CTR) every two days up to 10th postnatal day. On postnatal
37 day 60, estrous cycle started to be evaluated by vaginal smears twice a day for 15 days. Then,
38 animals were euthanized on estrous phase for blood and organs collection. When compared to
39 CTR, MSG rats had increased Lee Index, retroperitoneal and visceral fat pads accumulation, as
40 well as visceral adipocyte hypertrophy. They were dyslipidemic but did not exhibit
41 hyperglycemia or hyperandrogenemia. MSG rats were oligocyclic and had a 2-fold decrease on
42 oocyte count. Noteworthy, MSG rats had a 6-fold increase on ovarian follicular cysts, along
43 with higher number of total, primordial and atretic follicles. Immunohistochemical analysis
44 showed MSG rats had a 4-fold increase of anti-Müllerian hormone staining on antral follicles.
45 Together, data herein presented characterize MSG obesity model as an affordable and easy-to-
46 do model to study metabolic pathways underlying PCOS in young rats.

47

48 **Key-words:** Monosodium L-glutamate. Hypothalamic obesity. Metabolic syndrome. Polycystic
49 ovary syndrome. Pathophysiology.

50

51 INTRODUÇÃO

52 A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é o distúrbio de fertilidade mais comum em
53 mulheres, afetando 6-15% destas durante a idade reprodutiva em todo o mundo [1]. De acordo
54 com o Consenso de Rotterdam, diagnostica-se SOP pela presença de pelo menos dois dos
55 seguintes critérios: hiperandrogenismo sérico ou clínico, oligo/anovulação crônica e ovários
56 policísticos visualizados por ultrassom [2-5]. Ainda que não faça parte dos critérios
57 diagnósticos, evidências da última década têm demonstrado intrínseca relação entre SOP e
58 distúrbios metabólicos, como obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e diabetes tipo 2 [6-
59 9]. Além disso, etnia e herança genética também desempenham um papel na patogênese desta
60 síndrome [10]. Assim, devido à grande heterogeneidade de seus fatores de risco e co-
61 morbidades, a etiologia da SOP é mal compreendida e continua a ser uma questão de intensa
62 pesquisa.

63 Um número de modelos animais, variando a partir de ratos a macacos rhesus,
64 replicaram muitas das características fenotípicas da SOP em humanos [11-13]. Por exemplo, a
65 indução de SOP em ovelhas e macacas apresenta diversas características em comum às
66 mulheres, possivelmente devido a mecanismo reprodutivo semelhante [13-15]. No entanto, estes
67 modelos são muito caros e inviáveis para estudos baseados em manipulações genéticas. Por
68 outro lado, os roedores são mais adequados para estudar as consequências de insultos
69 fetais/perinatais, dado o seu curto tempo de vida, ciclo estral, poliovulação, facilidade de
70 manuseio e acessibilidade [16]. Em uma recente revisão, Walters e colaboradores [16] reuniram
71 e compararam todos os modelos de SOP em roedores. A maioria destes modelos baseia-se em
72 tratamentos a longo prazo com hormônios sexuais, seus agonistas ou antagonistas, bem como
73 modelos geneticamente modificados. Isto dificulta a popularização de tais modelos, pois
74 possuem alto custo-benefício e dependem de tecnologia de ponta. Depois de delinear as suas
75 vantagens e desvantagens, Walters e colaboradores concluíram que nenhum modelo mimetiza
76 totalmente a complexidade desta desordem clínica, tornando aconselhável o uso de mais de um
77 modelo para o progresso eficaz na compreensão da etiologia da SOP.

78 O modelo de obesidade induzido por L-glutamato monossódico (MSG) fora proposto
79 pela primeira vez por JW Olney, que descrevera as consequências metabólicas de injeções
80 subcutâneas de MSG em ratos [17] e macacos [18] recém-nascidos. O MSG promove
81 neurotoxicidade específica no núcleo arqueado e eminência mediana do hipotálamo [17, 18],
82 diminuindo a liberação do hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH).
83 Consequentemente, há prejuízo na secreção pulsátil do hormônio do crescimento (GH) por
84 somatossomos da hipófise anterior [19] e diminuição da concentração do fator de crescimento
85 similar à insulina 1 (IGF-1) em tecidos hepáticos e ósseos [20]. Não obstante, estes animais
86 também exibem um desequilíbrio do sistema nervoso autônomo, caracterizado por elevado
87 tônus parassimpático vs tônus simpático diminuído [21]. Assim, os roedores MSG em idade
88 adulta exibem diminuição do crescimento, obesidade, acúmulo de gordura, dislipidemia,
89 hiperleptinemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina [22-26].

90 Além de repercussões metabólicas, foi demonstrado que a administração de MSG reduz
91 a capacidade reprodutiva em roedores machos e fêmeas [27]. Em seu relatório inaugural, Olney
92 já havia sugerido que camundongos fêmeas MSG fossem estéreis [17], enquanto estudos
93 posteriores evidenciaram peso ovariano reduzido [28], ciclo estral alongado [29, 30], puberdade
94 tardia [31] e redução da fertilidade [32]. Outros analisaram a morfologia do ovário de roedores
95 MSG, sem resultados conclusivos. Sasaki e Sano [33] relataram aumento da atresia folicular
96 ovariana e ausência de corpo lúteo, enquanto Bojanić e colaboradores [34] encontraram muitos
97 folículos ovarianos atrésicos, com degeneração cística indefinida em ratas MSG. Recentemente,
98 foi demonstrado que ratas MSG com 75 dias apresentaram aumento do número de folículos
99 primários, porém sem detalhamento adicional por parte dos autores [35].

100 Ainda que haja estudos sobre a morfologia do ovário de roedoras MSG, não parece
101 haver uma análise profunda destas características. De forma que até o presente momento não há
102 relatos que demonstrem envolvimento destas disfunções reprodutivas presentes nas ratas MSG
103 com o desenvolvimento da SOP e suas consequências. Portanto, no presente estudo buscou-se
104 obter novas perspectivas sobre os parâmetros metabólicos e reprodutivos de ratas MSG, em uma

105 tentativa de propor este clássico modelo de obesidade como uma nova ferramenta para
106 investigar a etiologia e possíveis tratamentos da SOP no contexto da síndrome metabólica.

107 **MATERIAIS E MÉTODOS**

108 *Animais e tratamento*

109 Ratas Wistar prenas foram fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Federal
110 do Maranhão, São Luís - MA, Brasil. Após o parto, ratas recém-nascidas foram usadas neste
111 estudo. Todos os animais foram mantidos num ciclo de luz-escuro de 12 horas (luzes ligadas de
112 06:00 a 18:00), temperatura controlada de 22-24°C, com acesso a água e comida ad libitum, em
113 gaiolas com não mais do que quatro animais. Todos os procedimentos foram realizados com a
114 permissão do comitê de ética local, em conformidade com as regras estabelecidas pelo Conselho
115 Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (parecer substanciado n°
116 016/13).

117 *Procedimento de estudo*

118 Injetou-se L-glutamato monossódico (4 g / kg / dia; SIGMA, Saint Louis, MO, EUA;
119 grupo MSG n = 7) ou soro fisiológico equiosmolar (grupo CTR n = 8), por via subcutânea, em
120 dias alternados, de 2 a 10 dias de vida [17]. Os animais foram desmamados aos 21 dias de vida.
121 No 60° dia de vida, o Índice de Lee ($[\text{peso corporal } 1/3 \text{ (g) / comprimento naso-anal (cm)}] \times$
122 1000) [36] fora realizado para avaliação do desenvolvimento da obesidade, além de realizar o
123 esfregaço vaginal duas vezes ao dia para verificar a ciclicidade estral. Aos 73 dias de vida, todos
124 os animais foram mantidos em jejum por 8 horas para a coleta de sangue capilar da cauda para a
125 medição da glicemia (teste tira Accu-check Active®; Roche Diagnostic System, Branchburg,
126 NJ, Alemanha), ao passo que a trigliceridemia e colesterolemia foram determinadas por kits de
127 ensaio de espectrofotometria (Labtest®, Lagoa Nova, MG, Brasil). O índice TyG ($\ln [(\text{glicemia}$
128 $(\text{mg / dL}) \times \text{trigliceridemia (mg / dL)}) / 2]$) foi calculado para rastrear resistência à insulina
129 [37]. Todos os ratos foram sacrificados na fase estro do ciclo estral, entre 75 e 80 dias de vida.

130 No dia do sacrifício, o Índice de Lee fora refeito e os animais foram anestesiados com cetamina
131 (70mg / kg) e xilazina (10mg / kg) (Syntec®, Cotia, SP, Brasil). Coletou-se sangue por punção
132 aórtica, que então fora centrifugado e o soro estocado a -20°C até a análise. Pesou-se ovários,
133 útero e gorduras retroperitoneal e gonadal (visceral). Tubas uterinas foram coletadas
134 bilateralmente para análise em microscópio óptico. Os ovários e gordura anexa a este órgão
135 foram fixadas em paraformaldeído a 4% durante 24 horas, em seguida mantidos em álcool a
136 70% para posterior processamento histológico.

137 *Avaliação do ciclo estral*

138 Avaliou-se o ciclo estral através de lavados vaginais coletados duas vezes ao dia durante
139 pelo menos 15 dias consecutivos, como previamente descrito [38]. Ciclos regulares seguiram a
140 sequência: 1-2 observações em proestro, 1-4 observações em estro, 1-4 observações em
141 metaestro e 1-4 observações em diestro. Ciclos que não seguiram estritamente a sequência
142 acima foram considerados irregulares.

143 *Contagem de oócitos*

144 Após o sacrifício, tubas uterinas foram coletadas, embebidas em solução salina e, em
145 seguida, esmagadas entre duas lâminas de vidro para análise em microscópio óptico. O número
146 de oócitos em cada oviduto fora contado por pelo menos dois investigadores em duplo cego e a
147 soma das duas trompas foi considerada para cada animal, como descrito anteriormente [39].

148

149 *Morfologia ovariana*

150 Após a fixação em paraformaldeído e estocagem em álcool 70%, o ovário direito foi
151 incluído em parafina e cortado em secções de 4 µm. Os cortes foram corados com hematoxilina-
152 eosina (HE) e deu-se um espaçamento de 11 cortes entre as análises. Tendo em vista que o
153 diâmetro médio de um oócito é de cerca de 20-30 µm, ao analisar cada 11 cortes, assegura-se

154 uma distância de 44 μm , o que impede a múltipla contagem de um mesmo folículo. Apenas os
155 folículos que continham um oócito foram considerados. Os folículos foram classificados de
156 acordo com Hirshfield e Midgley [40]: folículos primordiais consistiram em uma camada de
157 células achatadas da granulosa em torno de um oócito; folículos primários tinham uma camada
158 de células cuboides da granulosa; folículos secundários continham um oócito rodeado por mais
159 de uma camada de células da granulosa e sem antro; folículos antrais apresentavam um oócito
160 rodeado por várias camadas de células da granulosa e continham um ou mais espaços antrais –
161 cumulus oophorus e camada teca também estavam presentes em alguns folículos antrais.
162 Considerou-se saudável todo folículo sem deformação nas camadas de células granulosas ou
163 teca ou núcleos picnóticos. Folículos atrésicos foram caracterizados pelo encolhimento ou
164 colapso de suas camadas, falta do oócito ou apresentando células da granulosa com pelo menos
165 dois núcleos picnóticos [41-44]. Folículos císticos foram considerados grandes cistos, cheios de
166 líquido, com fina camada de células da granulosa (1-4 camadas) e camada da teca espessa [41,
167 43, 45, 46].

168 *Imunohistoquímica*

169 Para a coloração de imunohistoquímica foram utilizadas lamínas com 3-
170 aminopropiltrietoxissilano (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Os cortes foram
171 desparafinados, bloqueados para a atividade da peroxidase endógena, lavados com PBS e
172 imersos em tampão de citrato a 90°C. As lâminas foram lavadas novamente com PBS e
173 bloqueadas para ligações não específicas em tampão de fosfato-albumina 5%. Em seguida, o
174 anticorpo primário para o hormônio anti-mülleriano (AMH) (R and D, Minneapolis, MN, EUA)
175 foi incubado em diluição de 1:400 a 4°C durante a noite. No dia seguinte as lâminas foram
176 lavadas em PBS, incubadas durante 30 minutos em temperatura ambiente com complexo de
177 estreptavidina-peroxidase de biotina (biotina avidina, diluídas a 1:50 em PBS; Vector
178 Laboratories, Burlington, ON, Canadá) e lavadas novamente com PBS. Ativou-se a atividade da
179 peroxidase com 3,tetracloridrato de 3-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
180 em água destilada e 0,03% de H₂O₂. Após uma lavagem final com PBS, todas as secções foram

181 contrastadas com hematoxilina por 12 segundos. Três cortes seriados foram corados e
182 analisados por animal. Dividiu-se os folículos em pré-antrais (primordial, primário e
183 secundário) e antrais. O percentual da área do folículo corada com AMH foi calculado através
184 do software ImageJ 1.48v (Institutos Nacionais de Saúde, EUA <http://imagej.nih.gov.ij>).

185 *Medição da área de adipócitos*

186 A gordura gonadal fora processada em conjunto com o ovário direito em cortes de 4µm.
187 Pelo menos 97 adipócitos foram analisados de cada animal, em 3-6 campos. Todos os cortes
188 continham pelo menos 100 µm de distância caso fosse necessário analisar mais de um corte.
189 Esta distância preveniu a múltipla análise do mesmo adipócito. As fotomicrografias foram
190 obtidas com uma ampliação de 200X. A área de adipócitos fora calculada utilizando o software
191 AxionVision (AxioVs40x64 V 4.9.1.0, Carl Zeiss Microscopia GmbH). Posteriormente, a
192 frequência de adipócitos por classe de tamanho semelhante, com intervalos de 500 µm², fora
193 calculada.

194 *Dosagem de hormônios sexuais séricos*

195 Os hormônios foram extraídos a partir de soro, antes do ensaio. Para tanto, o soro fora
196 descongelado em gelo para evitar picos de temperatura e degradação molecular. Em seguida,
197 adicionou-se éter etílico na proporção de 5:1 com a amostra e misturou-se bem. Esta mistura
198 fora centrifugada a 1000 × g durante 3 minutos para separar as fases. A camada superior (éter)
199 fora então coletada e armazenada em um tubo limpo, sendo esta etapa repetida duas vezes para
200 extração ótima. Correu-se a curva de precisão e encontrou-se um valor de coeficiente de r²>
201 0,96. Todas as dosagens foram medidas no mesmo dia. Para determinar as concentrações de
202 estradiol e de testosterona, kits comerciais foram utilizados (Roche Diagnostics GmbH,
203 Manheim, Alemanha).

204 *Análise estatística*

205 Os resultados são expressos como média \pm EPM nas tabelas e todos os gráficos são
206 apresentados como gráficos de box-plot, em que a caixa contém os percentis 25° e 75° e a linha
207 do meio é considerada como percentil 50 (mediana). Os traços indicam os valores superiores e
208 inferiores não classificados como outliers. Teste t de Student fora utilizado para os dados
209 acima referidos. Qui-quadrado fora utilizado na análise de folículo onde aparece percentual no
210 lugar de folículo por seção. As diferenças foram consideradas significativas para $P < 0,05$.

211 **RESULTADOS**

212 *Perfil metabólico e morfométrico*

213 Classicamente, injeções neonatais de MSG em roedores recém-nascidos causam danos
214 no hipotálamo, especialmente no núcleo arqueado e eminência mediana, resultando em
215 diminuição da secreção de GH e desequilíbrio autonômico caracterizado por baixo tônus
216 simpático *versus* alto tônus parassimpático [17, 19, 21]. Para assegurar a confiabilidade deste
217 modelo, parâmetros morfométricos metabólicos foram medidos aos 75 dias de vida em ambos
218 os grupos (Tabela 1). O peso corporal não diferiu entre os grupos, mas os animais MSG
219 mostraram-se mais curtos do que os CTR, o que contribuiu para a elevação de seus Índices de
220 Lee. Além disso, as ratas MSG apresentaram acúmulo de tecido adiposo. Especificamente,
221 houve acréscimo de quase 3 vezes nos depósitos de gordura retroperitoneal, enquanto os
222 depósitos de gordura visceral exibiram aumento de 3,5 vezes em relação às CTR. Curiosamente,
223 ratas MSG apresentaram tanto útero quanto ovários mais leves, provavelmente devido à
224 diminuição dos níveis circulantes de GH. A avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos
225 mostraram ratas MSG com glicemia menor e hipertrigliceridemia, apesar de não haver diferença
226 na colesterolemia. A resistência à insulina foi estimada pelo cálculo do índice TyG, que não
227 mostrou diferença entre os grupos. Tomados em conjunto, estes resultados reforçam que nossas
228 ratas MSG eram obesas e portadoras de síndrome metabólica aos 75 dias de idade.

229

230 **Tabela 1: Parâmetros morfométricos e bioquímicos séricos de ratas CTR e MSG**

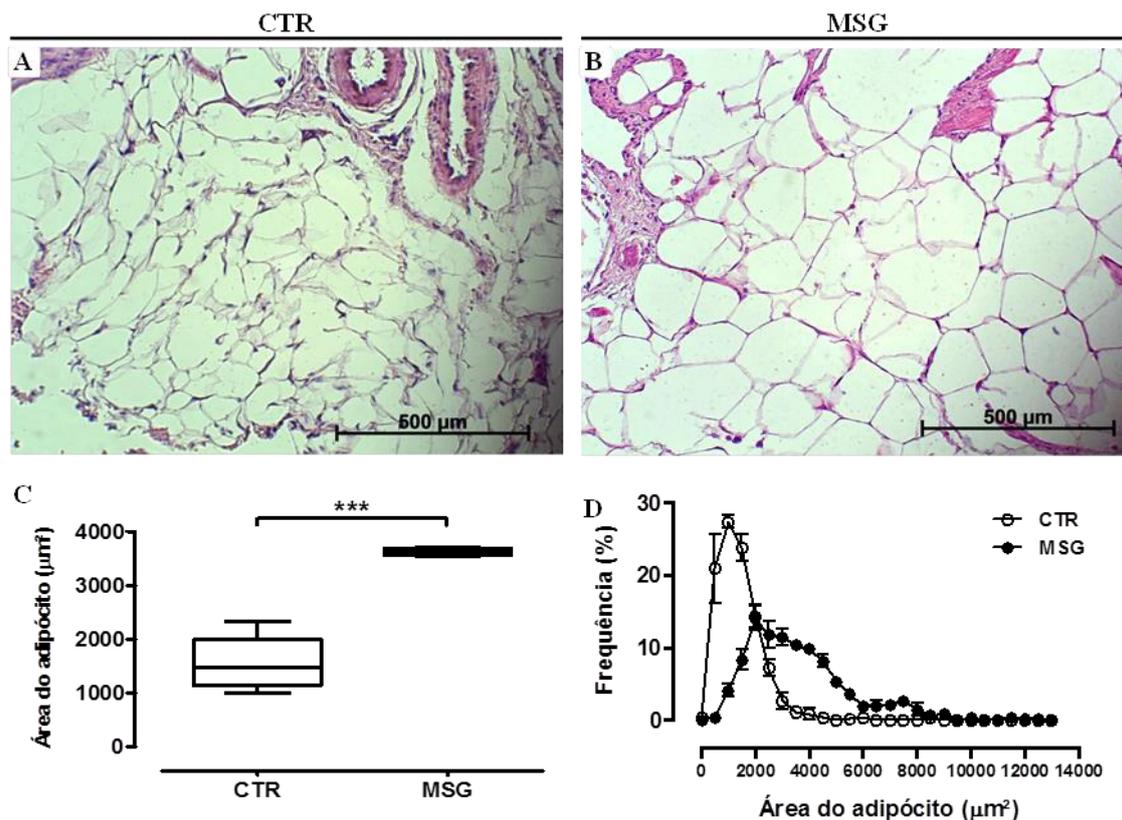
	CTR	MSG
<i>Parâmetros morfométricos</i>		
Peso (g)	166.40 ± 3.45	158.00 ± 3.70
Comprimento naso-anal (cm)	17.70 ± 0.12	16.03 ± 0.22**
Índice de Lee ((g ^{1/3} /cm)×1000)	310.60 ± 1.71	337.30 ± 2.99**
Gordura Retroperitoneal (g/100g)	1.08 ± 0.17	2.84 ± 0.26**
Gordura Visceral (g/100g)	1.08 ± 0.18	3.67 ± 0.33**
Útero (g/100g)	0.34 ± 0.02	0.20 ± 0.02**
Ovários (mg/100g)	0.15 ± 0.01	0.07 ± 0.00**
<i>Parâmetros metabólicos</i>		
Colesterolemia (mg/dL)	53.11 ± 3.06	59.30 ± 2.04
Glicemia (mg/dL)	111.00 ± 1.98	92.86 ± 3.59**
Trigliceridemia (mg/dL)	75.53 ± 8.07	106.80 ± 8.17*
Índice TyG ^a	8.28 ± 0.12	8.48 ± 0.10

231 Resultados são o valor médio ± EPM de n=5-7. *p < 0,05, **p < 0,001 *versus* CTR

232 ^a ln (glicemia jejum (mg/dL) × trigliceredemia jejum (mg/dL)/2)

233

234 Para melhor caracterizar os efeitos de distúrbios metabólicos no meio periovariano,
 235 analisou-se a gordura aderida ao ovário sob microscopia de luz. Painéis A e B da Figura 1
 236 mostram cortes de gordura coradas por HE para CTR e MSG, respectivamente. A mensuração
 237 da área média dos adipócitos de ratas MSG revelou aumento de duas vezes em comparação com
 238 animais CTR (CTR 1551 ± 223,70 vs MSG 3632 ± 32,73 μm², p < 0,001; Figura 1C). Digno de
 239 nota, a análise da distribuição morfométrica dos adipócitos juntamente com a sua área indicou
 240 que os animais MSG tinham aumento da frequência de adipócitos grandes, deslocando a curva
 241 para a direita (Figura 1D). Estes achados reiteram um desequilíbrio nos aspectos metabólicos
 242 das ratas MSG, que, por sua vez, poderia interferir no microambiente ovariano e em suas
 243 funções reprodutivas.

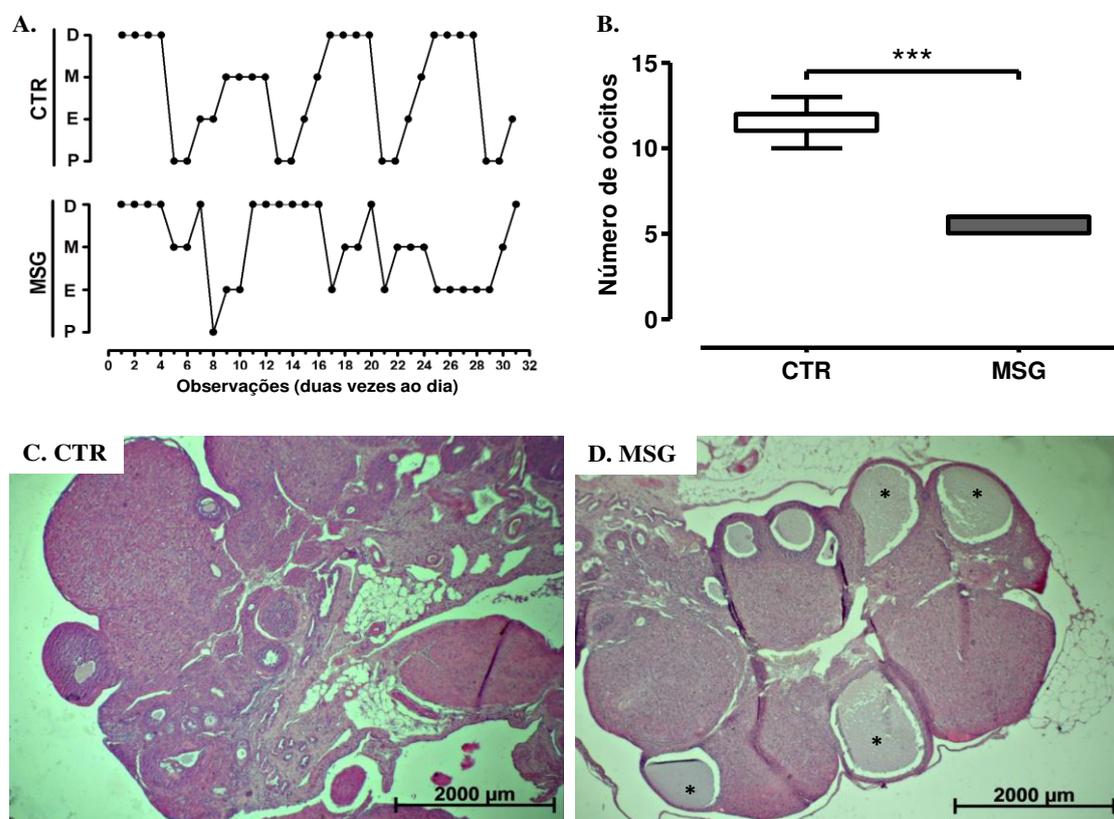


244
 245 **Figura 1. Aumento da área de adipócitos periovarianos em ratas obesas MSG.** Secções A e
 246 B são representativas de gordura periovariana corada com HE; animais CTR (A, n = 5) e MSG
 247 (B, n = 4). C. A média da área de adipócitos, demonstrada pelo gráfico em box-plot, ilustra a
 248 mediana (linha central) e os percentis 25 (limite inferior) e 75 (limite superior) de pelo menos
 249 97 adipócitos por animal. D. Gráfico com a frequência de distribuição por área de adipócitos
 250 CTR (círculos abertos) e MSG (círculos preenchidos). *** P < 0,001 vs CTR pelo teste *t* de
 251 Student.

252 *Ciclicidade, ovulação e morfologia ovariana*

253 A síndrome metabólica está intimamente associada com distúrbios reprodutivos que
 254 concorrem na SOP, tanto em mulheres quanto em roedoras. Tipicamente, os animais CTR
 255 mostraram ciclos regulares de 4-5 dias, ao passo que os MSG eram oligocíclicos, com menos
 256 progressão de proestro a estro e fases metaestro-diestro alongadas (Figura 2A). A ovulação foi
 257 avaliada por contagem de oócito *ex vivo*, a fresco. As ratas MSG mostraram uma diminuição de
 258 duas vezes na contagem de oócitos em comparação com as CTR (CTR $11,57 \pm 0,37$ vs $5,57 \pm$

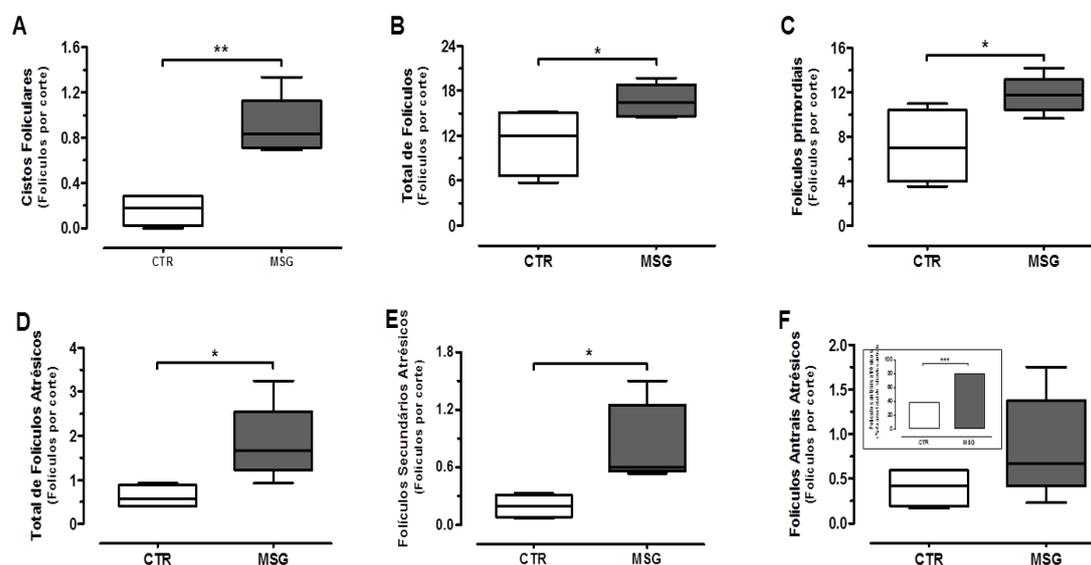
259 0,20 MSG, $p < 0,001$; Figura 2B). Estas alterações reprodutivas em animais MSG se refletem,
 260 ainda, sobre a morfologia de seus ovários, em que houve visivelmente, aumento no número de
 261 cistos foliculares em comparação com o grupo CTR (Figura 2C e D).



262
 263 **Figura 2. Ciclo estral, ovulação e histologia ovariana de animais CTR e MSG.** A. Padrão do
 264 ciclo estral representativo de CTR (topo) e MSG (parte inferior) avaliados através de lavados
 265 vaginais, onde: P, proestro; E, estro; M, metaestro; D, diestro. B. Gráfico de box-lot expondo
 266 análise *ex vivo* de oócitos após a ovulação de ratas CTR e MSG, sendo a mediana (linha central)
 267 e os percentis 25 (limite inferior) e 75 (limite superior). C e D. Cortes representativos de ovário
 268 CTR (C) e MSG (D) corados com HE; asteriscos (*) em D indicam cistos foliculares. *** P
 269 $< 0,001$ vs CTR pelo teste *t* de Student. $n = 7$ por grupo.

270 Para pormenorizar a morfologia dos folículos ovarianos, a análise quantitativa e
 271 qualitativa foi realizada sob microscopia de luz. A fim de evitar um viés, o número médio de
 272 folículos foi derivado a partir do número total de folículos dividido pelo número de cortes
 273 analisados. Animais MSG tiveram um espantoso aumento de 06 vezes em cistos foliculares

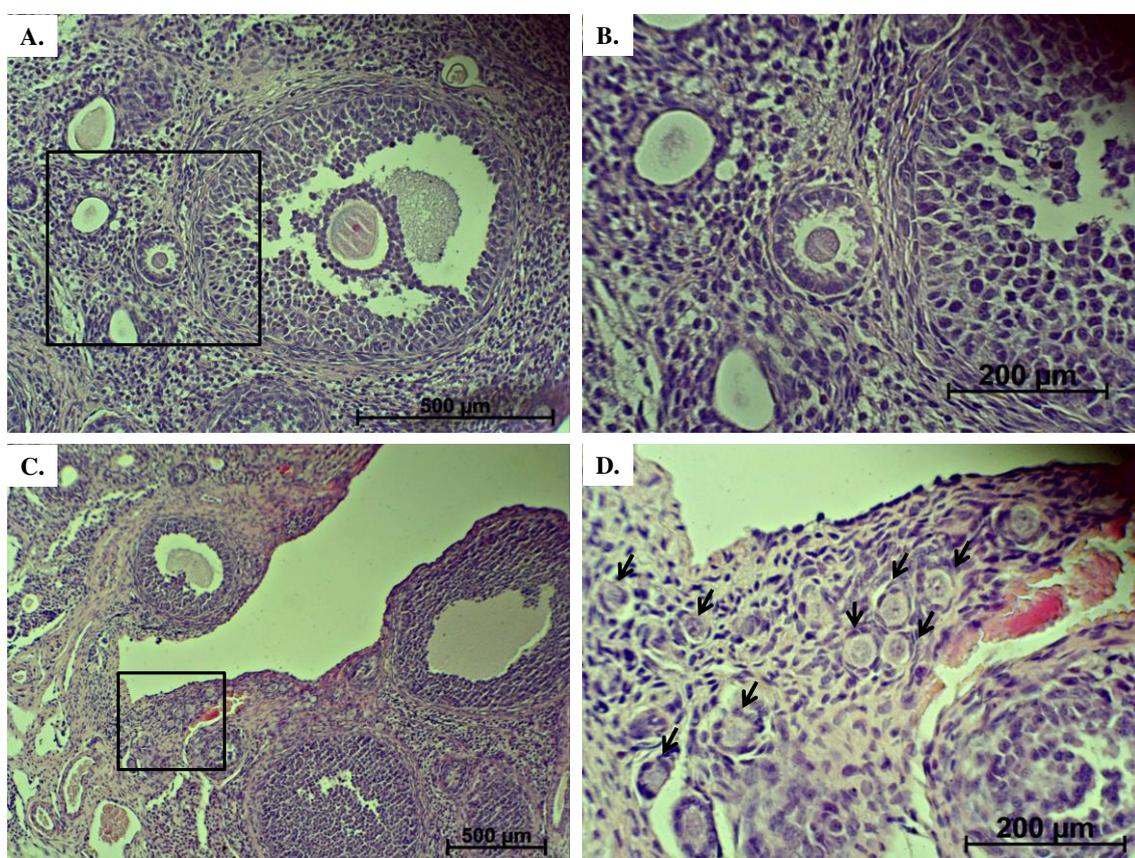
274 (CTR $0,16 \pm 0,07$ vs $0,90 \pm 0,11$ MSG, $p < 0,01$; Figura 3A), o que apoia fortemente o
 275 diagnóstico de SOP. Animais MSG também demonstraram elevação no número de folículos por
 276 corte, saudáveis e atrésicos, com excesso de folículos primordiais quando comparado aos CTR
 277 (CTR $11,24 \pm 2,27$ vs $16,69 \pm 0,99$ MSG, $p < 0,05$; Figura 3B; CTR $7,17 \pm 1,68$ vs $11,82$ MSG \pm
 278 $0,73$, $p < 0,05$; figura 3C). Além disso, MSG teve um aumento de duas vezes em folículos totais e
 279 secundários atrésicos (CTR $0,62 \pm 0,13$ vs $1,81 \pm 0,38$ MSG, $p < 0,05$; Figura 3D; CTR $0,20 \pm$
 280 $0,06$ vs $0,84 \pm 0,18$ MSG, $p < 0,05$; Figura 3E). Considerando que não encontramos aumento
 281 significativo nos folículos antrais atrésicos por corte, animais MSG possuíam 40% mais
 282 folículos antrais atrésicos em comparação com os CTR (Figura 3F e inserção).



283 **Figura 3. Análise histológica quantitativa de alterações ovarianas em ratas MSG. A a F.**
 284 Cortes histológicos de ovários de ratas CTR (n = 4) e MSG (n = 5). Corou-se cada 11° seção
 285 com HE para a contagem de folículos ovarianos. Folículos médios por seção de ratas CTR e
 286 MSG estão exibidos nos gráficos box-plot pela mediana (linha central) e os percentis 25 (limite
 287 inferior) e 75 (limite superior). O inserto em F mostra a correlação de folículos antrais atrésicos
 288 entre ratas CTR e MSG. * $P < 0,05$ vs CTR; ** $P < 0,01$ vs CTR analisados por teste *t* de student
 289 e qui-quadrado apenas no inserto.

291

292 Além de mudanças típicas na morfologia ovariana, ratas MSG exibiram peculiaridades
293 que não foram percebidas nas CTR. Especificamente, alguns ovários MSG continham folículos
294 atresícos primários (Figura 4A e B), o que retrata severa lesão degenerativa em um estágio
295 inicial de desenvolvimento do folículo. Notou-se que muitos animais MSG apresentavam áreas
296 de folículos primordiais densamente compactados, denotadas de ninhos de folículos primordiais
297 (Figura 3C e D). Todos estes dados corroboram com alterações encontradas em outros modelos
298 experimentais de SOP [16] e são sugestivos de uma associação intrínseca entre a síndrome
299 metabólica induzida por MSG e disfunções reprodutivas.



300
301 **Figura 4. Alterações ovarianas qualitativas observadas em ratas MSG.** As secções
302 representativas de ovários MSG corados por HE e que ilustram algumas alterações peculiares.
303 A. Folículo antral atresíco com antro degenerado, infiltração da granulosa e núcleos picnóticos.
304 B. Zoom em um folículo primário atresícos, com camada de células da granulosa e oócito
305 degenerados. C. Ninho de folículos primordiais, visto em magnificação de 100x. D. Zoom de C
306 destacando folículos primordiais (setas) que formam um ninho.

307

308 *Perfil dos hormônios sexuais*

309 Como o hiperandrogenismo está intimamente relacionado com a fisiopatologia da SOP,
 310 avaliamos as concentrações séricas de testosterona e estradiol. Segundo a Tabela 2, as ratas
 311 MSG tinham níveis semelhantes de testosterona e estradiol séricos, quando comparadas às CTR.
 312 Além disso, a relação testosterona/estradiol não apresentou diferença entre os grupos. Apesar da
 313 ausência de alterações nas dosagens de hormônios sexuais, sabe-se que a SOP pode ocorrer sem
 314 hiperandrogenismo [2].

315 **Tabela 2: Níveis séricos de hormônios sexuais em animais CTR e MSG**

	CTR	MSG
<i>Hormônios sexuais</i>		
Testosterona (ng/mL)	15.82 ± 0.66	15.15 ± 1.30
Estradiol (pg/mL)	14.23 ± 1.36	15.63 ± 2.46
Relação Testosterona/Estradiol	1.14 ± 0.11	1.06 ± 0.16

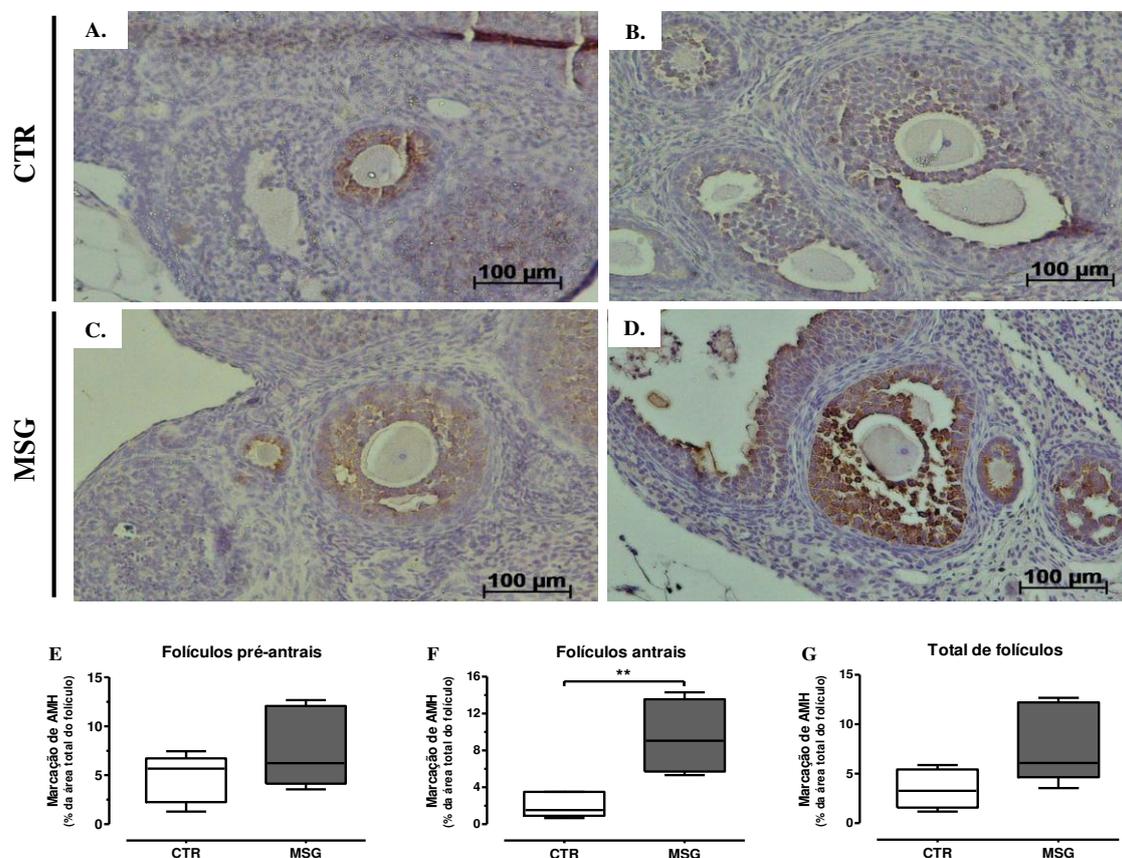
316 Resultados são o valor médio ± EPM de n=4-6.

317

318 *Imunohistoquímica com AMH*

319 Uma vez que a hipersecreção do AMH pelas células da granulosa tem sido associada
 320 com a SOP, tanto em mulheres e roedoras, realizamos a imunohistoquímica para este hormônio
 321 no ovário. Os dados na Figura 5 mostram aumento de coloração do AMH em ovários MSG, em
 322 comparação com os CTR (Figura 5A-D). A análise quantitativa não evidenciou diferença no
 323 percentual de coloração entre folículos pré-antrais (Figura 5E). Curiosamente, havia um
 324 aumento de 04 vezes na coloração de AMH em folículos antrais de ratas MSG (CTR 2,07 ±
 325 0,59 vs 9,43 ± 2,06 MSG, p<0,01; Figura 5F). Apesar do aumento da coloração em folículos
 326 antrais, não houve diferença significativa na coloração dos folículos totais (Figura 5G), o que
 327 pode estar relacionado à maior prevalência de folículos pré-antrais em oposição aos antrais. Em

328 conjunto, estes dados apontam para uma desregulação na camada de células da granulosa, com a
 329 maturação dos folículos ovarianos interrompida em ovários MSG.



330 **Figura 5. Coloração imunohistoquímica do hormônio anti-mülleriano (AMH) em ovários**
 331 **de ratas CTR e MSG.** Seções de ovários CTR (n = 5) e MSG (n = 4) foram submetidas a
 332 marcação com anticorpo para AMH e analisados três cortes seriados por animal. A a D. Secções
 333 representativas de folículos pré-antrais e antrais imunolocalizados para AMH são mostrados
 334 para CTR (A e B) e MSG (C e D), respectivamente. E a G. Percentual de coloração por AMH
 335 em folículos pré-antrais (E), antrais (F) e totais (G); este percentual é demonstrado por gráfico
 336 de box-plot, tendo mediana (linha central) e percentis 25 (limite inferior) e 75 (limite superior).
 337
 338 ** P < 0,01 vs CTR pelo teste *t* de Student.

339 DISCUSSÃO

340 O presente relatório evidenciou que injeções subcutâneas de MSG em ratas recém-
 341 nascidas produziu um fenótipo de obesidade de SOP tão cedo quanto 75 dias de vida,

342 assemelhando-se às características encontradas em mulheres. Ratas obesas MSG exibiram
343 hipertrigliceridemia, hipertrofia dos adipócitos viscerais, ciclo estral irregular, cistos foliculares
344 no ovário e folículos ovarianos atrésicos. Além disso, este modelo apresentou aumentada
345 coloração de AMH em folículos antrais e aumento da quantidade de folículos primordiais. Por
346 outro lado, os níveis séricos de hormônios sexuais, especialmente testosterona, não foram
347 afetados. Dada a ausência de hiperandrogenismo, ratas MSG revelam-se um modelo acessível e
348 de fácil manutenção para estudar os mecanismos metabólicos na fisiopatologia da SOP em
349 animais jovens.

350 Distúrbios metabólicos são altamente prevalentes entre mulheres com diagnóstico de
351 SOP e desempenham um papel importante na fisiopatologia desta síndrome. De fato, 38-88%
352 das mulheres com SOP são obesas [47, 48] ao passo que 50-70% têm resistência à insulina [49-
353 51]. Além disso, a obesidade tem sido associada a sintomas de SOP mais graves, enquanto que
354 tratamentos direcionados para perda de peso, tais como drogas e exercício, melhoram
355 significativamente os parâmetros reprodutivos [52]. Inúmeros mecanismos correlacionando
356 obesidade e SOP têm sido propostos; um dos quais consiste em insulina sérica elevada devido
357 ao aumento da deposição de gordura, hipertrigliceridemia e/ou resistência à insulina. É
358 importante notar que a hiperinsulinemia tem sido proposta como ente causador de SOP e a
359 ocorrência de hiperinsulinemia/resistência à insulina tem maior prevalência em mulheres com
360 SOP, independente do peso corporal [48, 53, 54].

361 Os dados aqui apresentados mostram que ratas MSG desenvolveram obesidade,
362 traduzida por um aumento em seus Índices de Lee, acúmulo de gordura visceral e
363 retroperitoneal e hipertrigliceridemia. Por outro lado, encontramos diminuição dos níveis de
364 glicose no soro destas ratas obesas. Isto pode ser explicado por uma exacerbada secreção de
365 insulina, já verificada em animais MSG [25], sem resistência à insulina estabelecida, devido à
366 pouca idade dos nossos animais. Em consonância com nossos achados, alguns relatórios
367 mostraram ratos MSG de 120 dias normoglicêmicos [55] e até ratos MSG de 6 meses com
368 glicemia menor do que os controles [24]. No entanto, até a presente data, existe escassez de

369 dados referentes às medições de glicemia em ratas MSG. Apesar de não termos medido os
370 níveis de insulinemia, constituindo uma limitação deste relatório, hiperinsulinemia é uma marca
371 amplamente descrita em casos de obesidade induzida por MSG [22-25, 56, 57], que, por sua
372 vez, nos permite propor que seja este um fator causal para o fenótipo metabólico observado em
373 nossas ratas MSG.

374 Outra característica metabólica importante encontrada em nossos animais MSG foi a
375 hipertrofia dos adipócitos na gordura visceral periovariana. A área média de adipócitos de
376 animais MSG foi duas vezes mais elevada do que a dos animais CTR, refletida por uma
377 transição à direita na curva de distribuição de frequência. Foi descrito que a hipertrofia de
378 adipócitos está relacionada à hiperinsulinemia [58] e hiperleptinemia [59]. Leptina afeta a
379 fisiologia reprodutiva estimulando a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH)
380 e hormônio luteinizante (LH) em ratos [60], além de agir diretamente no ovário ao perturbar a
381 maturação folicular e ovulação [61]. É interessante notar que a hiperleptinemia tem sido descrita
382 em ratos MSG tão jovens quanto 30 dias [62], atingindo um aumento de 10 vezes em 120 dias
383 de vida em fêmeas [56]. Assim, a hipertrofia dos adipócitos e consequente aumento dos níveis
384 de leptina podem contribuir para o desenvolvimento da SOP. Ademais, mulheres com SOP
385 exibiram aumento de 25% no diâmetro de seus adipócitos quando comparadas com a população
386 saudável de mesmo IMC [63], o que defende uma relação entre SOP e hipertrofia dos
387 adipócitos.

388 Ratas MSG também desenvolvem disfunções reprodutivas, que incluem a redução do
389 peso ovariano [28], curto ciclo estral [29, 30], puberdade tardia [31] e redução da fertilidade
390 [32]. Apesar destas características, há uma falta de estudos sobre a morfologia dos ovários de
391 ratas MSG. Sasaki e Sano [33] relataram aumento de atresia folicular ovariana e ausência de
392 corpo lúteo em animais MSG, enquanto Bojanić et al [34] encontraram muitos folículos
393 atrésicos e degeneração cística indefinida, sem mencionar se ali havia aumento de cistos
394 foliculares. Curiosamente, um estudo recente analisou ovários de ratas MSG com 75 dias de
395 vida, encontrando elevação no número de folículos primários, sem exploração adicional [35].

396 Portanto, a morfologia ovariana de fêmeas MSG ainda não foi analisada em profundidade de
397 modo a relacionar suas disfunções reprodutivas com o diagnóstico de SOP.

398 As nossas ratas MSG exibiram ciclo estral irregular, o que reforça descobertas
399 anteriores e corrobora com a conexão entre síndrome metabólica e distúrbios reprodutivos.
400 Ratas MSG eram oligocíclicas, ao invés de acíclicas, e tiveram duas vezes menos oócitos em
401 suas tubas uterinas após a ovulação. A maioria dos modelos de SOP em roedores mostra
402 fenótipo acíclico [16], que descreve perturbações mais graves do que as apresentadas em neste
403 estudo. Tem sido apontado que essas perturbações graves não refletem a SOP humana [46].
404 Além disso, as ratas MSG possuíam ovários mais leves quando comparados aos CTR, explicado
405 pela deficiência na secreção pulsátil de GH. É bem verdade que o aumento do volume ovariano
406 ao ultrassom é considerado uma característica importante para o diagnóstico de SOP em
407 mulheres [64], embora a maioria dos modelos em roedoras exiba peso ovariano reduzido [16].
408 Portanto, os oligociclos e a ovulação reduzida encontrados nas ratas MSG podem melhor se
409 correlacionar com alterações tipicamente encontradas em adolescentes e mulheres com SOP
410 [65].

411 Outras características definidoras de SOP consistem em anomalias na histologia do
412 ovário, tal qual o aumento da contagem de folículos, cistos foliculares e atresia [2, 16, 46].
413 Walters *et al* revisitaram modelos de SOP em roedores e observaram que todos os modelos pós-
414 natais com administração de androgênios e letrozole apresentavam ovários policísticos (PCO) e
415 atresia de folículos [16]. Modelos metabólicos da SOP, como o rato JCR:LA-cp geneticamente
416 modificado, com receptores de leptina não funcionantes, também apresentou PCO e atresia de
417 folículos ovarianos [46], ao passo que o rato obeso Neo Zelandês possuía atresia do folículo
418 sem PCO [66]. Notável destacar que nossas ratas MSG tiveram um aumento robusto de cistos
419 foliculares e folículos atrésicos, sugerindo um comprometimento no microambiente de seus
420 ovários. Tais cistos continham fina camada de células da granulosa com camada de células da
421 teca espessada, provavelmente refletindo sobre a produção hormonal intraovariana.

422 Curiosamente, folículos primários atrésicos foram visualizados somente nos ovários MSG, que
423 denotam grave comprometimento no desenvolvimento folicular.

424 Aumento no número de folículos primordiais se faz presente na SOP humana através de
425 uma combinação de mecanismos, envolvendo androgênios [67], AMH [68] e outros fatores.
426 Não obstante, poucos relatórios contaram folículos primordiais em modelos de SOP até o
427 presente momento. Destes, a exposição crônica a dihidrotestosterona (DHT) não influenciou no
428 número total de folículos primordiais [69], enquanto que o rato obeso Neo Zelandês tinham
429 mais folículos primordiais apenas com 85 dias de vida, mas não em animais mais velhos [66].
430 As nossas ratas MSG tiveram acréscimo no número de folículos primordiais, quando
431 comparadas às CTR. Este foi ainda caracterizado pela ocorrência de ninhos de folículos
432 primordiais, encontrados apenas em ratas MSG. O número total de folículos também elevou-se
433 em animais MSG, apesar de não detectarmos diferença em folículos mais maduros.

434 Tem sido demonstrado que os androgênios sintetizados pelas células da teca nos ovários
435 são essenciais para o desenvolvimento folicular saudável [70]. Por outro lado, ovários na SOP
436 tem um microambiente com excesso de androgênios, o que aumenta o recrutamento e
437 desenvolvimento folicular, em parte explicando por que os modelos SOP têm mais folículos
438 primordiais, bem como a atresia folicular e a formação de cistos [71]. A hiperinsulinemia
439 também contribui para a patogênese da SOP pois interfere na função ovariana. A insulina age
440 diretamente nas células da teca, sinergicamente com LH, regulando a síntese de testosterona
441 [72], conquanto evite o desenvolvimento folicular em mulheres [73]. Uma hipótese plausível de
442 hipersensibilidade à insulina no ovário, com consequências sobre a produção de androgênio
443 ovariano, tem sido proposta como a ligação entre SOP e síndrome metabólica [74].

444 Após diagnosticar SOP em nossas ratas MSG pela presença de oligociclos/oligovulação
445 e ovários policísticos, o próximo passo buscou possíveis mecanismos envolvidos no seu
446 desenvolvimento. Em primeiro lugar, foram avaliados os níveis séricos de testosterona e
447 estradiol. Surpreendentemente, não houve diferença entre os grupos para ambos os hormônios.

448 Por outro lado, o hiperandrogenismo não é consensual entre os modelos de SOP em animais.
449 Tratamento crônico com DHT [69] ou valerato de estradiol [75] não induziram
450 hiperandrogenismo em roedoras, bem como o rato obeso Neo Zelandês [66]. Também é
451 necessário salientar as dificuldades de dosagem de androgênios em mulheres [2, 64]. Mesmo
452 nas mulheres há dificuldades ao avaliar os níveis de testosterona. A maioria dos laboratórios
453 analisam o soro sem extração prévia, viés este que tentamos superar através da extração dos
454 hormônios com éter. Apesar de não haver diferença nos níveis séricos de testosterona,
455 esperamos que os futuros relatórios mensurem o teor de androgênio intraovariano em ratas
456 MSG.

457 Outra contribuição importante para o desenvolvimento da SOP é o AMH sintetizado no
458 ovário. Trabalhos anteriores mostram que o AMH inibe o crescimento dos folículos primordiais,
459 funcionando como um fator inibidor do crescimento durante as fases iniciais da foliculogênese
460 [76] e aumentando a população de folículos primordiais [77]. O AMH tem sido relacionado com
461 SOP, embora não haja consenso sobre a sua aplicação diagnóstica [2, 64]. As nossas ratas MSG
462 exibiram coloração para AMH aumentada em folículos antrais, mesmo que isto não refletisse na
463 coloração total de AMH quando comparado ao grupo CTR. Estes dados podem explicar, pelo
464 menos em parte, o mecanismo pelo qual os ovários MSG tiveram igual número de folículos
465 antrais desenvolvidos - primário, secundário e antral - apesar de ter mais folículos primordiais.
466 Curiosamente, nem a exposição pré-natal a testosterona [78], nem a exposição pós-natal crônica
467 a DHT [69] causaram aumento nos níveis de AMH no soro ou ovários. Ainda que os níveis
468 séricos de AMH não foram avaliados, o aumento da produção de AMH folículos antrais poderia
469 exercer um efeito parácrino nos folículos primordiais, impedindo o seu crescimento e
470 promovendo atresia folicular.

471 Em conclusão, nosso estudo fornece a primeira caracterização morfológica da SOP em
472 ratas MSG. Além disso, consistente com informações de que a SOP em humanos possa ocorrer
473 sem elevação dos níveis séricos de androgênios, nossos dados trazem novas perspectivas sobre a
474 aplicação das ratas MSG em estudos com enfoque nos mecanismos de interligação entre

475 distúrbios metabólicos e SOP. Digno de nota, a forte coloração de AMH em folículos antrais
476 MSG defende este caminho. Ademais, considerando que o modelo MSG é uma ferramenta
477 acessível e de fácil aplicabilidade, este trabalho abre perspectivas para investigações
478 fisiopatológicas e farmacológicas sobre a etiologia da SOP, podendo ser realizadas em regiões
479 desfavorecidas, democratizando o acesso ao conhecimento e desenvolvimento científico nesse
480 campo.

481 **AGRADECIMENTOS**

482 Nós gostaríamos de agradecer o excelente apoio técnico dado por Tiago da Silva Teófilo, do
483 Laboratório de Histologia da Universidade Federal do Maranhão, e Marco Antônio Sales dos
484 Santos, do Laboratório Gaspar. Agradecemos também à Dra. Janete Anselmo-Franci, do
485 Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por nos permitir
486 realizar nossa análise histológica piloto em seu laboratório.

487 **REFERÊNCIAS**

- 488 1. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The
489 prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting
490 diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010; 25:544-551.
- 491 2. Rotterdam EA-SPCWG. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term
492 health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81:19-25.
- 493 3. Pasquali R, Stener-Victorin E, Yildiz BO, Duleba AJ, Hoeger K, Mason H, Homburg R,
494 Hickey T, Franks S, Tapanainen JS, Balen A, Abbott DH, et al. PCOS Forum: research in
495 polycystic ovary syndrome today and tomorrow. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; 74:424-433.
- 496 4. Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome:
497 etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7:219-231.

- 498 5. Lobo RA, Carmina E. The importance of diagnosing the polycystic ovary syndrome.
499 *Ann Intern Med* 2000; 132:989-993.
- 500 6. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet*
501 2007; 370:685-697.
- 502 7. Ehrmann DA, Liljenquist DR, Kasza K, Azziz R, Legro RS, Ghazzi MN, Group PCTS.
503 Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary
504 syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:48-53.
- 505 8. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352:1223-1236.
- 506 9. Essah PA, Wickham EP, Nestler JE. The metabolic syndrome in polycystic ovary
507 syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50:205-225.
- 508 10. Welt CK, Duran JM. Genetics of polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med* 2014;
509 32:177-182.
- 510 11. Singh KB. Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. *Fertil*
511 *Steril* 2005; 84 Suppl 2:1228-1234.
- 512 12. West C, Foster DL, Evans NP, Robinson J, Padmanabhan V. Intra-follicular activin
513 availability is altered in prenatally-androgenized lambs. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185:51-59.
- 514 13. Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, Colman RJ, Kemnitz JW. Insights into the
515 development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies of prenatally androgenized
516 female rhesus monkeys. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9:62-67.
- 517 14. Eisner JR, Barnett MA, Dumesic DA, Abbott DH. Ovarian hyperandrogenism in adult
518 female rhesus monkeys exposed to prenatal androgen excess. *Fertil Steril* 2002; 77:167-172.
- 519 15. Recabarren SE, Padmanabhan V, Codner E, Lobos A, Duran C, Vidal M, Foster DL,
520 Sir-Petermann T. Postnatal developmental consequences of altered insulin sensitivity in female

- 521 sheep treated prenatally with testosterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E801-
522 806.
- 523 16. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary
524 syndrome. *Biol Reprod* 2012; 86:149, 141-112.
- 525 17. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with
526 monosodium glutamate. *Science* 1969; 164:719-721.
- 527 18. Olney JW, Sharpe LG. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with
528 monosodium glutamate. *Science* 1969; 166:386-388.
- 529 19. Maiter D, Underwood LE, Martin JB, Koenig JI. Neonatal treatment with monosodium
530 glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on
531 pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinology* 1991; 128:1100-1106.
- 532 20. Nakagawa T, Ukai K, Ohyama T, Gomita Y, Okamura H. Effects of chronic
533 administration of sibutramine on body weight, food intake and motor activity in neonatally
534 monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with
535 monoamines. *Exp Anim* 2000; 49:239-249.
- 536 21. Andreazzi AE, Grassioli S, Marangon PB, Martins AG, de Oliveira JC, Torrezan R,
537 Gravena C, Garcia RM, Mathias PC. Impaired sympathoadrenal axis function contributes to
538 enhanced insulin secretion in prediabetic obese rats. *Exp Diabetes Res* 2011; 2011:947917.
- 539 22. Hirata AE, Andrade IS, Vaskevicius P, Dolnikoff MS. Monosodium glutamate (MSG)-
540 obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz*
541 *J Med Biol Res* 1997; 30:671-674.
- 542 23. Zhang N, Huan Y, Huang H, Song GM, Sun SJ, Shen ZF. Atorvastatin improves insulin
543 sensitivity in mice with obesity induced by monosodium glutamate. *Acta Pharmacol Sin* 2010;
544 31:35-42.

- 545 24. Liu SN, Liu Q, Li LY, Huan Y, Sun SJ, Shen ZF. Long-term fenofibrate treatment
546 impaired glucose-stimulated insulin secretion and up-regulated pancreatic NF-kappa B and
547 iNOS expression in monosodium glutamate-induced obese rats: is that a latent disadvantage? J
548 Transl Med 2011; 9:176.
- 549 25. Miranda RA, Agostinho AR, Trevenzoli IH, Barella LF, Franco CC, Trombini AB,
550 Malta A, Gravena C, Torrezan R, Mathias PC, de Oliveira JC. Insulin oversecretion in MSG-
551 obese rats is related to alterations in cholinergic muscarinic receptor subtypes in pancreatic
552 islets. Cell Physiol Biochem 2014; 33:1075-1086.
- 553 26. Franca LM, Freitas LN, Chagas VT, Coelho CF, Barroso WA, Costa GC, Silva LA,
554 Debbas V, Laurindo FR, Paes AM. Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with
555 monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation.
556 Biochem Biophys Res Commun 2014; 443:725-730.
- 557 27. Pizzi WJ, Barnhart JE, Fanslow DJ. Monosodium glutamate administration to the
558 newborn reduces reproductive ability in female and male mice. Science 1977; 196:452-454.
- 559 28. Lamperti A, Blaha G. The effects of neonatally-administered monosodium glutamate on
560 the reproductive system of adult hamsters. Biol Reprod 1976; 14:362-369.
- 561 29. Nagasawa H, Yanai R, Kikuyama S. Irreversible inhibition of pituitary prolactin and
562 growth hormone secretion and of mammary gland development in mice by monosodium
563 glutamate administered neonatally. Acta Endocrinol (Copenh) 1974; 75:249-259.
- 564 30. Shapiro BH, Albucher RC, MacLeod JN, Bitar MS. Normal levels of hepatic drug-
565 metabolizing enzymes in neonatally induced, growth hormone-deficient adult male and female
566 rats. Drug Metab Dispos 1986; 14:585-589.
- 567 31. Lorden JF, Caudle A. Behavioral and endocrinological effects of single injections of
568 monosodium glutamate in the mouse. Neurobehav Toxicol Teratol 1986; 8:509-519.

- 569 32. Campos KE, Volpato GT, Calderon IM, Rudge MV, Damasceno DC. Effect of obesity
570 on rat reproduction and on the development of their adult offspring. *Braz J Med Biol Res* 2008;
571 41:122-125.
- 572 33. Sasaki F, Sano M. Roles of the arcuate nucleus and ovary in the maturation of growth
573 hormone, prolactin, and nongranulated cells in the mouse adenohypophysis during postnatal
574 development: a stereological morphometric study by electron microscopy. *Endocrinology* 1986;
575 119:1682-1689.
- 576 34. Bojanic V, Bojanic Z, Najman S, Savic T, Jakovljevic V, Najman S, Jancic S. Diltiazem
577 prevention of toxic effects of monosodium glutamate on ovaries in rats. *Gen Physiol Biophys*
578 2009; 28 Spec No:149-154.
- 579 35. Das RS, Ghosh SK. Long-term effects in ovaries of the adult mice following exposure
580 to monosodium glutamate during neonatal life--a histological study. *Nepal Med Coll J* 2011;
581 13:77-83.
- 582 36. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in
583 weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 1968; 40:527-528.
- 584 37. Simental-Mendia LE, Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F. The product of fasting
585 glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy
586 subjects. *Metab Syndr Relat Disord* 2008; 6:299-304.
- 587 38. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of
588 rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002; 62:609-614.
- 589 39. Bernuci MP, Szawka RE, Helena CV, Leite CM, Lara HE, Anselmo-Franci JA. Locus
590 coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Endocrinology* 2008; 149:2907-
591 2916.

- 592 40. Hirshfield AN, Midgley AR, Jr. Morphometric analysis of follicular development in the
593 rat. *Biol Reprod* 1978; 19:597-605.
- 594 41. Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. Development of the polycystic ovarian condition
595 (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod* 1986; 35:647-655.
- 596 42. Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winston RM, Franks S, Hardy K. Effects
597 of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian
598 follicles. *Hum Reprod* 1999; 14:1555-1562.
- 599 43. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. An
600 increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a
601 principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 2000;
602 141:1059-1072.
- 603 44. Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, Franks S. Formation and
604 early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet* 2003; 362:1017-1021.
- 605 45. Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin
606 E. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary
607 syndrome. *Endocrinology* 2007; 148:3781-3791.
- 608 46. Shi D, Dyck MK, Uwiera RR, Russell JC, Proctor SD, Vine DF. A unique rodent model
609 of cardiometabolic risk associated with the metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome.
610 *Endocrinology* 2009; 150:4425-4436.
- 611 47. Balen AH, Conway GS, Kaltsas G, Techatrasak K, Manning PJ, West C, Jacobs HS.
612 Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod* 1995;
613 10:2107-2111.
- 614 48. Sir-Petermann T, Codner E, Perez V, Echiburu B, Maliqueo M, Ladron de Guevara A,
615 Preisler J, Crisosto N, Sanchez F, Cassorla F, Bhasin S. Metabolic and reproductive features

- 616 before and during puberty in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin*
617 *Endocrinol Metab* 2009; 94:1923-1930.
- 618 49. Franks S, Gharani N, Gilling-Smith C. Polycystic ovary syndrome: evidence for a
619 primary disorder of ovarian steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 69:269-272.
- 620 50. Pasquali R, Gambineri A, Biscotti D, Vicennati V, Gagliardi L, Colitta D, Fiorini S,
621 Cognigni GE, Filicori M, Morselli-Labate AM. Effect of long-term treatment with metformin
622 added to hypocaloric diet on body composition, fat distribution, and androgen and insulin levels
623 in abdominally obese women with and without the polycystic ovary syndrome. *J Clin*
624 *Endocrinol Metab* 2000; 85:2767-2774.
- 625 51. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic
626 ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26:883-896.
- 627 52. Wu C, Lin F, Qiu S, Jiang Z. The characterization of obese polycystic ovary syndrome
628 rat model suitable for exercise intervention. *PLoS One* 2014; 9:e99155.
- 629 53. Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of polycystic ovary
630 syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60:1-17.
- 631 54. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome
632 revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev* 2012; 33:981-1030.
- 633 55. Yamazaki RK, Brito GA, Coelho I, Pequitto DC, Yamaguchi AA, Borghetti G,
634 Schiessel DL, Kryczyk M, Machado J, Rocha RE, Aikawa J, Iagher F, et al. Low fish oil intake
635 improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-
636 obese rats. *Lipids Health Dis* 2011; 10:66.
- 637 56. Moreno G, Perello M, Camihort G, Luna G, Console G, Gaillard RC, Spinedi E. Impact
638 of transient correction of increased adrenocortical activity in hypothalamo-damaged,
639 hyperadipose female rats. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30:73-82.

- 640 57. Savcheniuk O, Kobyliak N, Kondro M, Virchenko O, Falalyeyeva T, Beregova T.
641 Short-term periodic consumption of multiprobiotic from childhood improves insulin sensitivity,
642 prevents development of non-alcoholic fatty liver disease and adiposity in adult rats with
643 glutamate-induced obesity. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14:247.
- 644 58. Gao M, Ma Y, Liu D. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic
645 steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PLoS One* 2015; 10:e0119784.
- 646 59. Couillard C, Mauriege P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A,
647 Bouchard C, Despres JP. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell
648 hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24:782-
649 788.
- 650 60. Watanobe H. Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-
651 releasing hormone secretion in vivo in rats. *J Physiol* 2002; 545:255-268.
- 652 61. Escobar-Morreale HF, San Millan JL. Abdominal adiposity and the polycystic ovary
653 syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18:266-272.
- 654 62. Franca LR, Suescun MO, Miranda JR, Giovambattista A, Perello M, Spinedi E,
655 Calandra RS. Testis structure and function in a nongenetic hyperadipose rat model at
656 prepubertal and adult ages. *Endocrinology* 2006; 147:1556-1563.
- 657 63. Manneras-Holm L, Leonhardt H, Kullberg J, Jennische E, Oden A, Holm G, Hellstrom
658 M, Lonn L, Olivecrona G, Stener-Victorin E, Lonn M. Adipose tissue has aberrant morphology
659 and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex
660 steroids, are strongly associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;
661 96:E304-311.
- 662 64. Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Franks S,
663 Gambineri A, Kelestimur F, Macut D, Micic D, Pasquali R, Pfeifer M, Pignatelli D, et al. The

- 664 polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology.
665 Eur J Endocrinol 2014; 171:P1-29.
- 666 65. Hickey M, Doherty DA, Atkinson H, Sloboda DM, Franks S, Norman RJ, Hart R.
667 Clinical, ultrasound and biochemical features of polycystic ovary syndrome in adolescents:
668 implications for diagnosis. Hum Reprod 2011; 26:1469-1477.
- 669 66. Radavelli-Bagatini S, Blair AR, Proietto J, Spritzer PM, Andrikopoulos S. The New
670 Zealand obese mouse model of obesity insulin resistance and poor breeding performance:
671 evaluation of ovarian structure and function. J Endocrinol 2011; 209:307-315.
- 672 67. Smith P, Steckler TL, Veiga-Lopez A, Padmanabhan V. Developmental programming:
673 differential effects of prenatal testosterone and dihydrotestosterone on follicular recruitment,
674 depletion of follicular reserve, and ovarian morphology in sheep. Biol Reprod 2009; 80:726-
675 736.
- 676 68. Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome
677 NP, Themmen AP, Visser JA. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the
678 primordial follicle pool in mice. Endocrinology 2006; 147:3228-3234.
- 679 69. van Houten EL, Kramer P, McLuskey A, Karels B, Themmen AP, Visser JA.
680 Reproductive and metabolic phenotype of a mouse model of PCOS. Endocrinology 2012;
681 153:2861-2869.
- 682 70. Gleicher N, Kim A, Weghofer A, Kushnir VA, Shohat-Tal A, Lazzaroni E, Lee HJ,
683 Barad DH. Hypoandrogenism in association with diminished functional ovarian reserve. Hum
684 Reprod 2013; 28:1084-1091.
- 685 71. Jonard S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian
686 hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. Hum Reprod Update 2004;
687 10:107-117.

- 688 72. Nestler JE. Insulin regulation of human ovarian androgens. *Hum Reprod* 1997; 12
689 Suppl 1:53-62.
- 690 73. Willis DS, Watson H, Mason HD, Galea R, Brincat M, Franks S. Premature response to
691 luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary
692 syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3984-
693 3991.
- 694 74. Baillargeon JP, Nestler JE. Commentary: polycystic ovary syndrome: a syndrome of
695 ovarian hypersensitivity to insulin? *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:22-24.
- 696 75. Stener-Victorin E, Ploj K, Larsson BM, Holmang A. Rats with steroid-induced
697 polycystic ovaries develop hypertension and increased sympathetic nervous system activity.
698 *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:44.
- 699 76. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW,
700 Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of
701 primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; 143:1076-1084.
- 702 77. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P,
703 Fauser BC, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary:
704 potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:77-
705 83.
- 706 78. Tehrani FR, Noroozzadeh M, Zahediasl S, Piryaei A, Azizi F. Introducing a rat model
707 of prenatal androgen-induced polycystic ovary syndrome in adulthood. *Exp Physiol* 2014;
708 99:792-801.
- 709

Especificações da Revista (Biology of Reproduction)

Figura de referência e citações. Cite referências, tabelas, figuras e dados complementares consecutivamente. Números de referência entre colchetes, por exemplo, "como Smith [12] relatou" ou "conforme relatado anteriormente [3-5]." Os autores serão cobrados quaisquer alterações às referências na fase de prova.

Fontes. Apenas fontes padrão, tais como Helvetica ou Times New Roman devem ser usadas.

Numeração de linhas. Manuscritos submetidos sem numeração de linha serão devolvidos aos autores para correção.

Espaçamento entre linhas. Espaço duplo em todo o texto.

Tamanho. Atualmente não há limite para página ou palavras para manuscritos da BOR; no entanto, para conter os custos de publicação e reduzir a fadiga leitor, manuscritos devem ser concisos e evitarem a reiteração e redundâncias.

Numeração de páginas. Número de páginas no canto superior direito.

Configuração de página. Escolha tamanho carta, 8-1 / 2 "x 11" papel. Defina todas as margens em uma polegada.

Folha de rosto.

Título. Indique as espécies estudadas, usando itálicos, conforme necessário. Não use abreviações ou siglas. Soletrar caracteres gregos.

Título corrido. O título de 50 ou menos caracteres, incluindo espaços. Isso será exibido como a cabeça de execução de seu trabalho publicado.

Sentença-resumo. Um resumo de uma frase do significado do manuscrito (limitado a 250 caracteres). Não use frases como "este trabalho demonstra ..." ou "nós mostramos que ..."

Exemplos de declarações sumárias adequadas são:

O greatstuff proteína (GTSF), que é produzida pelo oócito em desenvolvimento, é essencial para o desenvolvimento da pré-implantação do embrião para além do estágio de duas células.

Regulação fotoperíodo de transporte de aminoácidos no cérebro influencia o comportamento de desova de guppies.

Células de Sertoli de rato promovem alta expressão de mRNA e proteína clutz clutz por espermatócitos; o fenótipo de uma mutação nula no gene clutz é azoospermia.

Palavras-chave. Palavras-chave da página do título aparece na primeira página da publicação final. Não há limite para o número de palavras-chave que podem ser fornecidas.

Autores e afiliações. Liste todos os autores e forneça o nome completo (incluindo departamentos e / ou divisões) e localização (ie, cidade, estado, país) de cada instituição onde o trabalho foi realizado. Não use abreviações ou siglas, e não forneça endereços de rua. Use números arábicos sobrescritos para digitar os autores às instituições.

Financiamento. Indique apoio financeiro (ou seja, nomes de agências de financiamento e os números de concessão ou contrato, se aplicável) na nota 1. Não incluem informações sobre financiamento na seção Agradecimentos.

Apresentação de conferência (se aplicável). Se qualquer pesquisa no manuscrito foi apresentado em outro lugar, indique aqui (por exemplo, "Apresentado em parte na 45a Reunião Anual da Sociedade para o Estudo da Reprodução, 12-15 agosto de 2012, State College, Pensilvânia.").

Correspondência. O autor correspondente deve ser indicado na nota 2; a nota de rodapé deve dar as informações de contato completo, incluindo endereço, para esta pessoa.

Notas de rodapé adicionais. Se dois ou mais autores contribuíram igualmente para o trabalho, ou se o endereço de contato do autor mudou desde que foi realizada a pesquisa, essa informação deve ser fornecida nas notas separadas.

Resumo.

Em um máximo de 250 palavras, resuma o propósito do trabalho, os métodos utilizados e as conclusões. Não apresente dados ou referências. Evite abreviações e acrônimos, e soletrar caracteres gregos.

Introdução.

Fornecer uma declaração clara do problema e cite a literatura relevante sobre o assunto. Não inclua os resultados ou declarações sumárias.

Materiais e métodos.

Ética.

Deve ser declarado e documentado que as investigações com animais experimentais ou assuntos foram conduzidos de acordo com as diretrizes e normas específicas do SSR.

Materiais.

Nomes de marcas. Use nomes genéricos de produtos químicos, fármacos, anticorpos, reagentes, enzimas, etc., quando possível. As marcas devem ser utilizadas se a composição dessa marca é fundamental para a metodologia. Se um nome de marca é dado, também deve ser indicado o nome do fabricante. Por exemplo:

Kit Dynabeads mRNA DIRECT (Invitrogen)

ANOVA one-way (software Prism versão 3.03; GraphPad)

FSHR (1: 1000 de diluição, ab65975; Abcam, Inc.)

Composição. Especifique a composição de todas as soluções, tampões, misturas, e meios de cultura (incluindo PBS) se um nome de marca e fabricante não são fornecidos.

Materiais doados. Fornecer afiliações institucionais de indivíduos ou empresas que doaram suprimentos ou reagentes.

Símbolos de marca registrada. Não use marca ou símbolos registrados com marcas ou nomes de empresas.

Métodos.

Forneça aos leitores informações suficientes para replicar o trabalho. Trabalho inédito não pode ser citado para fornecer validação de metodologia. Incluir métodos estatísticos utilizados para análise dos dados. Use as referências a métodos publicados, se eles são idênticos aos métodos utilizados no presente estudo.

Resultados.

Apresentar os resultados em detalhe apropriado, usando o verbo no passado. Consulte as tabelas e figuras em ordem, sem discussão.

As sequências de nucleótidos deve ser submetido ao GenBank, EMBL, ou DNA Banco de Dados do Japão, e o número de acesso ea data de adesão referido no texto. Autores são encorajados a fornecer um link para o depósito ao invés de proporcionar a sequência completa no texto.

Dados de genômica e proteômica deve ser depositado com o repositório expressão gênica e matriz hibridização dados NCBI (GEO). O número de acesso GEO e sequência informações depósito deve ser referenciado na nota 1, depois de alguma informação financiamento.

Discussão.

Fornecer uma interpretação clara e concisa dos resultados; evitar a repetição dos resultados.

Agradecimentos

Reconhecer qualquer assistência não financeira (por exemplo, análise estatística, ajuda técnica, assistência editorial, criação de animais, etc.).

Referências.

Obras aceitáveis. Pode ser utilizado apenas artigos publicados ou aceitos para publicação. Os artigos devem ter aparecido em publicações revisadas por pares ou de outras obras publicadas que são acessíveis para a maioria dos cientistas. Os artigos que foram "aceitos condicionalmente", "submetido", ou estão "em processo" não são aceitáveis. Se um documento foi aceito, mas não foi publicado em sua forma final (ou seja, informações citação completa ainda não está disponível), por favor, indicar que o documento é "in press" (ver artigo de jornal, publicada ahead of print).

Os resumos. Um resumo pode ser usado como uma referência somente se ele tiver sido publicado em uma edição regular de um jornal prontamente disponível e indexado.

/ Referências on-line da Internet. Todo o material on-line deve ser citado por completo e deve incluir o endereço na web e data de acesso pelos autores. Muitas fontes on-line fornecem uma citação sugerida.

Dados inéditos. Cite comunicações pessoais e dados não publicados somente se necessário. No texto, proporcionar o nome (s) do indivíduo (s) associado com os dados não publicados. Por exemplo, "(Smith and Winter, dados não publicados).

Precisão. Os autores são responsáveis pela exatidão de todas as referências. Se as alterações de referência são necessários na prova, os autores serão cobrados para cada alteração.

Ordem. Todas as referências devem ser citadas em ordem numérica no texto usando colchetes (por exemplo, "como Smith [12] relatou" ou "conforme relatado anteriormente [3-5]") e deve aparecer nessa ordem na seção theReferences. Se uma citação de referência só aparece em uma tabela ou figura, número que faz referência última. Por exemplo, se existem 50 referências no texto, quatro em uma mesa, e dois em uma figura, as referências no texto seriam numerados 1-50, as referências na tabela seria numeradas 51-54, e as referências na figura seriam numerados 55-56.

DICA: Procure por "[" em seu documento do Word ou PDF para ver uma lista de suas referências no texto. Use essa lista para garantir que suas referências estão em ordem numérica.

Apresentação. Liste até 12 autores e / ou editores de uma publicação. Se houver mais de 12 autores, liste a apenas 12 primeiro seguido de "et al." Abreviar nomes de diário de acordo com fontes de série para o banco de dados BIOSIS, Index Medicus, ou do PubMed Jornal navegador. Os números das páginas deve ser inclusivo (por exemplo, 722-729, não 722-29).

NOTA: Usuários podem baixar um arquivo .ENS no estilo BOR no site da notas finais (tipo "Biologia da Reprodução" no campo Nome da publicação).

Resumo em Biologia da Reprodução.

Vo TTB, Jeung EB. Expressão calbindina-D9k em células GH3 é um biomarcador de potencial xenoestrogenic de parabens. In: Resumos da 43a Reunião Anual da Sociedade para o Estudo da Reprodução, 31 julho - 3 agosto de 2010, Milwaukee, Wisconsin. Biol Reprod 2010; 83 (suppl): 275 Abstract.

Kwon DK, Koo JO, Parque SJ, Kang JT, Parque HJ, Kim SJ, Lua JH, Saadeldin IM, Jang G, Lee BC. Otimizando suína ovócitos ativação elétrica, ajustando o tempo de exposição manitol pré e pós-ativação. In: Suplemento Biologia da Reprodução do Quadragésimo Quarta Reunião

Anual da Sociedade para o Estudo da Reprodução, 31 julho - 4 agosto de 2011, Portland, Oregon. Biol Reprod 2011; Suppl: Abstract 176.

Reserve.

Sokol RR, Rohlf FJ. Biometria. New York: WH Freeman e Co; 1981: 253-261.

Capítulo de livro.

Harrison RJ, Weir BJ. Estrutura do ovário de mamífero. In: Zuckerman S, Weit BJ (eds.), O ovário, vol. 1, 2a ed. New York: Academic Press; 1977: 113-217.

Banco de Dados.

Rato Tumor Biology banco de dados (MTB), Genoma do Camundongo Informática. Bar Harbor, ME: O Laboratório Jackson; 2004. <http://www.informatics.jax.org>. Acessado em 11 de Outubro de 2012.

Fonte Internet.

Mammalian Genética Reprodutiva [Internet]. Seattle, WA: University of Washington. <http://mrg.genetics.washington.edu>. Acessado em 12 de Janeiro de 2012.

Artigo de jornal, 12 ou menos autores.

Demas GE, Nelson RJ. Fotoperíodo, temperatura ambiente, e disponibilidade de alimentos interagem para afetar a função reprodutiva e imunológica em ratos de cervos machos adultos (*Peromyscus maniculatus*). J Biol Ritmos de 1998; 13: 253-262.

Artigo de jornal, mais de 12 autores.

Okasaki Y, Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, Nikaido I, Osato N, Saito R, Suzuki H, Yamanaka I, et al. Análise do transcriptoma do rato com base na anotação funcional de 60.770 cDNAs completos. *Nature* 2002; 420: 563-573.

Artigo de jornal, publicada ahead of print.

Aitken-Palmer C, Hou R, Burrell C, Zhang Z, Wang C, R Spindler, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J. sazonalidade reprodutiva prolongada no panda gigante macho (*Ailuropoda melanoleuca*) refletiu por padrões nos perfis de andrógenos, características ejacular , e comportamentos seleccionado. *Biol Reprod* 2012; (Na imprensa). Publicado online ahead of print 04 de abril de 2012; DOI 10,1095 / biolreprod.112.099044.

Artigo de jornal, e-journal.

Yuen T, Wurmbach E, Pfeffer RL, Ebersole BJ, Sealfon SC. Precisão e calibração de cDNA de oligonucleotídeos e personalizado microarrays comerciais. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: E48.

Patente.

Smith C, Jones K (inventores). Os Estados Unidos da América, representado pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos, cessionário. Peptídeos Adreno-medullin. Patente EUA 6 320 022; 2001.

Tese ou dissertação.

Wilson K. Os efeitos da substância P, neurotensina e vasopressina arginina sobre a função reprodutiva. Londres, Reino Unido: Universidade de Londres; 1984. Tese.